

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20848

研究課題名(和文)リンパ性悪性腫瘍におけるdexamethasone投与の意義についての研究

研究課題名(英文)Study on the Significance of Dexamethasone in Lymphoid Malignancies

研究代表者

白崎 良輔 (Shirasaki, Ryosuke)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：40569133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄性白血病を除く全ての疾患においてステロイドは抗がん剤として使用される。しかしステロイドの抗がん機序については明確ではない。我々はGenome-scale CRISPR activation screenによるdexamethasoneの殺細胞効果の同定を目的としてLymphomaの細胞であるRAJI及びCELの細胞であるEOL-1細胞を使用し実験を行った。結果RAJIにおいてはBCL2L11を含む遺伝子群をEOL-1細胞ではPLAURを含む遺伝子群を増殖因子として認めた。更にDexamethasone治療ではRAJI細胞においてUSP17L19を含む遺伝子群が耐性因子として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回発見した遺伝子群はこれら白血病に対する増殖因子であり、現在までに報告されていないものがほとんどである。特に好酸球性白血病細胞を使用したCRISPR activation screeningでは上記PLAURの他に好酸球の分化に関わる遺伝子群を新たに発見し、更にこの実験が正しいと証左に足る増殖因子として喘息において重要なサイトカインであるIL33が増殖因子となる事も判明した。また、RAJI細胞におけるDexamethasone耐性因子としてユビキチン化阻害タンパクのUSP17L19が見つかりこの経路の阻害がDexamethasone感受性を上げる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Steroids are utilized as anticancer agents in various diseases, excluding myeloid leukemia. However, the exact mechanism of steroids as anticancer agents remains unclear. In this study, our objective was to identify the cell-killing effects of dexamethasone through a Genome-scale CRISPR activation screen. We conducted experiments using RAJI cells, a lymphoma cell line, and EOL-1 cells, a cell line derived from CEL. The results revealed a gene cluster including BCL2L11 as a proliferative factor in RAJI cells, whereas a gene cluster including PLAUR was identified in EOL-1 cells. Furthermore, dexamethasone treatment led to the identification of a gene cluster containing USP17L19 as a resistance factor in RAJI cells.

研究分野：Biology of cancer

キーワード：EOL1 慢性好酸球性白血病 Lymphoma RAJI

1. 研究開始当初の背景

血液悪性腫瘍においてリンパ悪性腫瘍疾患は多岐にわたる。特に骨髄性白血病を除く全ての疾患においてステロイドは抗がん剤として使用される。一方でこれらステロイドの抗がん機序については依然として明確ではない。ステロイドは TF である NR3C1 に結合し downstream target の down-regulation, up-regulation を起こし殺細胞効果を起こす。幼弱リンパ球、成熟リンパ球、形質細胞の腫瘍はそれぞれ急性リンパ性白血病(ALL)、リンパ腫(ML)、多発性骨髄腫(MM)であり治療にはステロイドが使われるが、治療の直接の downstream target はそれぞれ違うと考えられる。

Broad Institute の Cancer dependency map group のデータ <https://depmap.org/portal/>からもこれらリンパ悪性疾患は成熟段階によりそれぞれ別の dependency を有する事が分かっている。例えば ALL における MYB、ML における BTK や MM における IRF4 などはそれぞれの腫瘍における分化段階固有の selective dependency を持つ。特に MM において dexamethasone は IRF4 を down-regulate させることにより殺細胞効果を持つと考えられているものの、この作用は ALL や ML には無い。ALL や ML において BCL2, BAX や BCL2L11 がステロイドの downstream target としてそれぞれ示唆されているが根拠を non-bias manner には示せていない。

2. 研究の目的

ステロイド薬は 1940 年台より様々なリンパ悪性腫瘍疾患または多発性骨髄腫に治療薬として使用されている。特に dexamethasone は Glucocorticoid Receptor (NR3C1) 特異的に結合し核内移行し Transcription factor (TF) として働くことが判明しているものの抗がん効果を起こす downstream target ははっきりしていない。近年の CRISPR-CAS9 テクノロジーの発達によって遺伝子の Knock-out (KO) や activation が簡単に行われるようになり全遺伝子学的検討が non-bias に行われるようになった。これに伴い現在までにメカニズムが判明しないまま使用されていた薬剤に対する感受性を変化させる遺伝子群やターゲットそのものが次々と明らかになっている。今回申請者は Dexamethasone の genome-scale CRISPR activation screen と公表されている Gene expression Omnibus のデータを再解析する事によってリンパ性白血病、リンパ腫における dexamethasone の downstream target の同定および新規併用療法を探索する事を目的とした。

3. 研究の方法

急性リンパ性白血病細胞 REH、リンパ腫細胞である RAJI 細胞を用い dCAS9-VP64 をレンチウイルスにて導入し、Blasticidin による selection を行った。しかし、REH 細胞に対し dCAS9-VP64 を遺伝子導入する事は何度か行った導入でも不可能であった。このため、まずは RAJI 細胞に CRISPRa 用の sgRNA バックボーンである pXPR_502 を使用し ABCB1 の sgRNA を cloning し ABCB1 たんぱく発現上昇をフローサイトメトリー (FCM) にて確かめた。

さらに、十分量 (300 x 10⁶) の細胞を得たのちに low infection efficiency 30% を目標に Calabrese sgRNA library (Addgene# 92379, 92380) を導入した。その後 Puromycin による 7 日間の selection を行い transduction 後の細胞が 30x10⁶ 細胞が生存するのを確認し (1 つの sgRNA を導入された細胞が 500 細胞以上存在する状態) 2 週間程度増殖させ実験に必要な 180 million 細胞を得た。その後 IC60/4days (治療後に 40x10⁶ 細胞残存) を目標に dexamethasone 治療を行った。コントロール (CTRL) 細胞は DMSO を投与し、それぞれ 3 日または 4 日おきに dexamethasone または DMSO の入ったメディウムを交換した。それぞれの細胞は biological duplicate のセッティングでメディウム交換時に細胞をカウントし細胞が 30x10⁶ を超えた場合には余剰細胞は破棄し、4 週間の治療の後に細胞はペレットダウンされ PCR で sgRNA を増幅後に Next-generation sequence によって sgRNA の分布を DMSO で治療された CTRL 細胞と比較した。

4. 研究成果

Aim Genome-scale CRISPR activation screen による dexamethasone の NR3C1 を介した殺細胞効果の downstream target の同定。

ALL、リンパ腫細胞に対する dexamethasone 治療抵抗性を全遺伝子的 CRISPRa screen において網羅的に解析し downstream target を同定する。

我々はこの実験過程において RAJI 細胞及び、REH 細胞を使用した CRISPR activation screening を施行する予定であった。しかし残念な事に REH 細胞の増殖能力が悪く Dexamethasone の感受性を持つ他の細胞腫で行わざるを得なくなった。このため我々は当研究室で保有していた慢性好酸球性白血病細胞株であり Dexamethasone 感受性株である EOL-1 細胞を代用として用いる事した。RAJI 細胞の CRISPRa screening の結果で

あるが USP17L19、SLC18A3、MATN4、SNTG2、GRAP、SFTPD が Top hit として見られた。これら遺伝子が耐性を起こすかの validation は現在進行中である。

また、dexamethasone の治療メカニズム解析として REH 細胞の代わりに EOL-1 細胞の dexamethasone を使用した CRISPRa screening を行った。実験は終了したものの予算の関係から Next generation sequence に進めておらず control 細胞のみの結果を示す。

この CTRL 細胞は plasmid と比較を行う事により慢性好酸球性白血病の増殖因子を発見することが可能である。この結果、PLAUR、IL33 の他多数の遺伝子が好酸球に関連する増殖因子として見られた。PLAUR の個別 activation 細胞は更に m-Cherry-luc の形質導入を行い CTRL 細胞との competition assay も施行した。PLAUR の activation 細胞と CTRL の OR12D2 の activation 細胞を 1:9 でフラスコ内に入れ 8 週間にわたり培養しその経過を Flow Cytometry で解析した。この結果フラスコ内の 8 週間後には PLAUR:OR12D2=5:5 の細胞数まで増殖し PLAUR の activation は EOL-1 細胞において増殖を起こす事が証明された。今後 RNA-seq による網羅的 transcriptome 解析や Mass-spectrometry による網羅的タンパク解析を行い PLAUR と好酸球のメカニズムを探索する予定である。

これら結果は 2023 年度の日本血液学会で発表を行った。

今回頂いた予算内で予定された実験を全て終わらせることは出来なかったものの非常に興味深い知見が得られ、更なる実験と検討が必要となると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小松 美結、白崎 良輔、野添 瑞貴、小原 俊、田代 晴子 |
| 2. 発表標題 The novel TKI-resistant mechanism of CEL cell line with FIP1L1-PDGFR α . |
| 3. 学会等名 第85回日本血液学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|